

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
G 0 1 N 27/27		C 1 2 M 1/34	A 2 G 0 4 5
C 1 2 M 1/34		C 1 2 Q 1/02	4 B 0 2 9
C 1 2 Q 1/02		G 0 1 N 33/483	F 4 B 0 6 3
G 0 1 N 27/327		27/46	A
33/483		27/30	3 5 1
		審査請求 未請求	予備審査請求 有 (全 40 頁)

(21)出願番号 特願2001-530574(P2001-530574)
 (86)(22)出願日 平成12年9月12日(2000.9.12)
 (85)翻訳文提出日 平成14年4月5日(2002.4.5)
 (86)国際出願番号 P C T / E P 0 0 / 0 8 8 9 5
 (87)国際公開番号 W O 0 1 / 0 2 7 6 1 4
 (87)国際公開日 平成13年4月19日(2001.4.19)
 (31)優先権主張番号 1 9 9 4 8 4 7 3 . 2
 (32)優先日 平成11年10月8日(1999.10.8)
 (33)優先権主張国 ドイツ (D E)

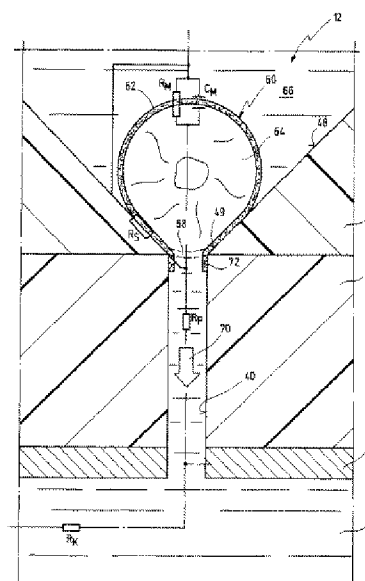
(71)出願人 エンエムイー ナトゥヴィッセンシャフト
 リヘス ウント メディツィニシェス イ
 ンスティテュート アン デル ウニヴェ
 ルシタト ティュービンゲン
 ドイツ連邦共和国 72770 ロイトリンゲ
 ン マルクヴィーゼンシュトラッセ 55
 (71)出願人 パイア アクチェンゲゼルシャフト
 ドイツ連邦共和国 51368 レパーケーゼ
 ン (番地なし)
 (72)発明者 ニッシュ ヴィルフリート
 ドイツ連邦共和国 72072 ティュービン
 ゲン ビスマルクシュトラッセ 20
 (74)代理人 弁理士 中村 稔 (外9名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 液体環境内にある細胞の測定を行なう方法および装置

(57)【要約】

本発明は、液体環境(66)内に含まれた細胞(60)の測定を行なう方法および装置に関する。本発明によれば、各細胞(60)の膜(62)の下面(68)は一表面(48)上に位置決めされる。前記表面(48)にはチャンネル(40)としての孔が穿けられており、前記チャンネル(40)内には、吸引力により細胞(60)を付着させるべく負圧(70)が発生される。細胞(60)は、該細胞から或る距離を隔てて配置された少なくとも1つの電極(50)を介して電氣的に識別される。負圧(70)は、膜(62)により包囲された細胞内部(64)とチャンネル(40)との間に連通が形成されるように膜(62)を開通させるべく、パルス態様で発生させるのが好ましい。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 液体環境（66）内に含まれた細胞（60、112）の測定を行なう方法であって、少なくとも1つのチャンネル（40、88、122）が貫通している表面（48、82、128）上に、各細胞（60、112）の膜（62）の下面（68）が吸引されて位置決めされ、圧力差（70）が確立され、かつ細胞（60、112）が少なくとも1つの電極（44、50；100、126）を介して電氣的にスキヤニングされる構成の測定方法において、膜（62）の下面（68）が、圧力差を増大させることにより破裂され、および／または膜（62）が、ポア形成物質の添加によりまたは電流パルスにより微孔性を有しかつ電氣的に低抵抗なものとされ、または破裂されることを特徴とする測定方法。

【請求項2】 前記膜（62）を破裂させる圧力差が、パルス態様で増大されることを特徴とする請求項1記載の測定方法。

【請求項3】 前記細胞（60）を位置決めするのに、マイクロキューベット（12、84）の底部（48、82）を使用することを特徴とする請求項1または2記載の測定方法。

【請求項4】 前記細胞（60、112）は、膜（62）の下面から間隔を隔てて配置された電極（50、100、126）を介して、チャンネル（40、88、122）の方向に電氣的にスキヤニングされることを特徴とする請求項1～3のいずれか1項記載の測定方法。

【請求項5】 細胞内部（64）に電流（ I_{st} ）が通されるか、電位測定が行なわれることを特徴とする請求項1～4のいずれか1項記載の測定方法。

【請求項6】 複数のチャンネル（40、88、122）を有し、膜面（68）を開通させるべく圧力差または電流パルスを増大させるパルス（70）が、全てのチャンネル（40、88、122）で同時に発生されることを特徴とする請求項1～5のいずれか1項記載の測定方法。

【請求項7】 複数のチャンネル（40、88、122）を有し、膜面（68）を開通させるべく圧力差または電流パルスを増大させるパルス（70、98）が、選択された個々のチャンネルまたは複数のチャンネル（40、88、122）で連続的に発生されることを特徴とする請求項1～5のいずれか1項記載の

測定方法。

【請求項8】 物質の添加により細胞内媒体（116）の組成を変えるか、細胞内液体媒体（116）を置換することを特徴とする請求項1～7のいずれか1項記載の測定方法。

【請求項9】 液体環境（66）内の細胞（60、112）の電氣的測定を行なう装置であって、貫通チャンネル（40、88、122）を備えた基板（34、86）を有し、細胞（60、112）が、その膜（62）の下面（68）が基板（34、86）の表面（49、85、128）上に位置するようにして配置され、チャンネルに沿って圧力差（70）を発生させる手段（56）と、細胞（60、112）の電氣的スキニングを行なう第1電極（44）とを更に有する構成の測定装置において、少なくとも1つの第2電極（50、100、126）が、前記第1電極（44）からチャンネル（40、88、122）の方向に間隔を隔てて配置されていることを特徴とする測定装置。

【請求項10】 静圧差（70）を発生させて細胞付着状態を確立する目的、および圧力差（70）をパルス態様で増大させて膜（62）の下面（68）を破裂させる目的で圧力差（70）を制御する手段（56、58）が設けられていることを特徴とする請求項9記載の測定装置。

【請求項11】 前記第2電極（50）は、第1電極（44）から遠い方のチャンネル（40）の側に配置されていることを特徴とする請求項9または10記載の測定装置。

【請求項12】 前記第2電極（50）は、チャンネル（40）の前記第1電極（44）から遠い方の端部を環状に包囲していることを特徴とする請求項11記載の測定装置。

【請求項13】 前記チャンネル（122）は、前記第1電極（44）から遠い方の端部が、弁（118、120）を介して多数のチャンネル（130、132）に連結されており、該チャンネル（130、132）を介して流体（ F_1 、 F_2 ）を供給または排出できることを特徴とする請求項9～12のいずれか1項記載の測定装置。

【請求項14】 多数のチャンネル（40、88、122）が共通基板（3

4、86、110)に配置されていることを特徴とする請求項9～13のいずれか1項記載の測定装置。

【請求項15】 前記基板(34、86)上にマイクロキューベット(12、84)が配置されており、該マイクロキューベットの底部(48、82)には開口(49、88)が設けられていることを特徴とする請求項9～14のいずれか1項記載の測定装置。

【請求項16】 前記チャンネル(40、88、122)の内側幅(x)は10 μ m以下、好ましくは5 μ m以下であることを特徴とする請求項9～15のいずれか1項記載の測定装置。

【請求項17】 前記多数のマイクロキューベット(12、84)が、プレート(10、80)に配置されていることを特徴とする請求項14～16のいずれか1項記載の測定装置。

【請求項18】 前記プレート(12、80)は多層構造を有していることを特徴とする請求項17記載の測定装置。

【請求項19】 前記プレート(10)は、頂層(36)と、中間層と底層(32)とを有し、マイクロキューベット(12)が頂層(36)に配置され、中間層はチャンネル(40)が配置された基板(34)を形成し、底層(32)には、チャンネル(40)に通じる連結チャンネル(38)が設けられていることを特徴とする請求項18記載の測定装置。

【請求項20】 前記基板(34、86)は底層(32)に接合されており、該底層(32)は、チャンネル(40、88、122)に通じている連結チャンネル(38)を備えた光学的パターン形成可能な材料で形成された1つ以上の層からなることを特徴とする請求項1～19のいずれか1項記載の測定装置。

【請求項21】 前記底層(32)はガラスマウントに取り付けられることを特徴とする請求項20記載の測定装置。

【請求項22】 前記連結チャンネル(38)は、10～40 μ m、好ましくは約20 μ mの幅(b₂)を有していることを特徴とする請求項19～21のいずれか1項記載の測定装置。

【請求項23】 前記電極(50)は基板(34)の下面上または底層(3

2) の頂面上に配置されていることを特徴とする請求項19～22のいずれか1項記載の測定装置。

【請求項24】 前記電極(50)は、一辺の長さが20～60 μ m、好ましくは約40 μ mの正方形であることを特徴とする請求項23記載の測定装置。

【請求項25】 前記電極(50)に導かれた導体トラック(52)が、基板(34)と底層(32)との間に配置されていることを特徴とする請求項23または24記載の測定装置。

【請求項26】 前記導体トラック(52)は、5～30 μ m、好ましくは約10 μ mの幅(b_1)を有していることを特徴とする請求項25記載の測定装置。

【請求項27】 互いに独立している少なくとも頂層(36)、底層(32)または基板(34)は、プラスチック、より詳しくは、ポリメチルメタクリレート(PMMA)、シリコン、PTFE、ポリイミド、または無機材料、より詳しくは、シリコン、セラミック材料またはガラスで作られていることを特徴とする請求項19～26のいずれか1項記載の測定装置。

【請求項28】 前記基板(34、86)は、2～40 μ m、好ましくは約5 μ mの層厚を有することを特徴とする請求項19～27のいずれか1項記載の測定装置。

【請求項29】 前記基板(34、86)はシートからなり、該シートには複数のチャンネル(40、88)がドリル孔の形態に形成されていることを特徴とする請求項9～28のいずれか1項記載の測定装置。

【請求項30】 前記基板(86)はプレート(80)の下面上に配置され、プレート(80)には複数のドリル孔がマイクロキューベット(84)として形成されており、該マイクロキューベット(84)の底部(82)は、チャンネル(88)が孔として形成されている基板(86)により形成されていることを特徴とする請求項29記載の測定装置。

【請求項31】 前記基板(86)はプレート(36)の下面上に配置され、プレート(36)には複数のドリル孔がマイクロキューベット(12)として形成されており、該マイクロキューベットの底部(48)の孔(49)は、基板(3

4) のチャンネル (40) の中心を合わせるにより形成されていることを特徴とする請求項 29 または 30 記載の測定装置。

【請求項 32】 流体／測定ユニット (90) が設けられており、該流体／測定ユニット (80) はチャンバ (92、124) を有し、該チャンバ (92、124) は、基板 (86、110) の下面に向って開口しており、かつ選択されたチャンネル (88、122) に連通しかつ下面に対してシールされるようにして基板 (86、110) の下面に位置決めでき、チャンバ (92、124) は少なくとも 1 つの電極 (100、126) を有しかつ負圧源に連結された少なくとも 1 つのターミナルチャンネル (96、130、132) に連結できることを特徴とする請求項 14～18 のいずれか 1 項記載の測定装置。

【請求項 33】 前記チャンバ (124) は、弁 (118、120) を介して多数のターミナルチャンネル (130、132) に連結されることを特徴とする請求項 32 記載の測定装置。

【請求項 34】 前記プレート (80) および流体／測定ユニット (90) を互いに横行させかつ位置決めする横行ユニット (104) が設けられていることを特徴とする請求項 32 または 33 記載の測定装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、液体環境内に含まれた細胞の測定を行なう方法であって、少なくとも1つのチャンネルが貫通している表面上に、各細胞の膜の下面が吸引されて位置決めされ、圧力差が確立され、かつ細胞が少なくとも1つの電極を介して電氣的にスキャンされる構成の測定方法に関する。

【0002】

また本発明は、液体環境内の細胞の電氣的測定を行なう装置であって、貫通チャンネルを備えた基板を有し、細胞が、その膜の下面が基板の表面上に位置するようにして配置され、チャンネルに沿って圧力差を発生させる手段と、細胞の電氣的スキャンを行なう第1電極とを更に有する構成の測定装置に関する。

【0003】

(背景技術)

上記形式の方法および装置はドイツ国特許DE 1 97 12 309 A1に開示されている。

【0004】

生体細胞の研究にいわゆる微小電極配列を用いることは知られており、微小電極配列は、例えば細胞を刺激または細胞電位のタップ（中間取出し）を行なうのに使用されている。研究は、生物学的環境内または人工的環境内で行なわれる。この目的のための配列はマトリックス内に多数の微小電極を有し、該電極の直径は、ほぼ細胞の大きさ、すなわち数 μm ～数十 μm の範囲内にある。この一般的な形式の微小電極配列は、例えば国際特許出願WO 97/05922に開示されている。

【0005】

慣用の微小電極配列では、特定電極上に1つの細胞または他の何らかの細胞が沈着するか否かは、或る程度、偶然を当てにしなければならない。実際に、細胞は、一般に、電極上に沈着するときに極く一部が電極をカバーするに過ぎず、このため、細胞の刺激または細胞電位のタッピングはこのサブ領域に制限されてし

まう。また、細胞は、電極上に軽く載っているに過ぎないため、基準電極に対するシーリング抵抗に関する問題が生じる。或いは、細胞は電極の範囲外に位置することがあり、このため、これらの細胞の測定は行なわれない。

【0006】

上記ドイツ国特許DE197 12 309 A1に開示された微小電極配列の場合には、これらの欠点は、底部に電極が設けられたマイクロキューベット内に収集される細胞により回避される。電極には中央チャンネルが設けられており、該チャンネル内には、電極の下を通る適当な連結チャンネルを介して負圧を発生させることができる。かくして、個々の細胞を制御された態様で電極に吸引して、或る接触圧力で電極に付着させることができる。次に、電極上で測定を行なうことができるが、細胞の外部からの測定ができるに過ぎない。

【0007】

いわゆるパッチクランプ (Patch Clamp) 技術のような他の技術から、負圧を用いたピペットで細胞を吸引することは知られている (US-Z "NATURE", vol. 260 (第799～801頁、1976年) 参照)。しかしながら、パッチクランプ技術は、ピペットを制御された態様で個々の細胞に接近させる必要がある。パッチクランプ技術では、接触される細胞が移動することはない。なぜならば、一般に、細胞は基板に付着しているからである。しかしながら、パッチクランプピペットを用いた細胞の慣用的な接触は、多数のピペットを恣意的に培養チャンバ内に導入できないというスペース上の理由のため、同時に接触できる細胞の数が極めて制限されるという欠点を有している。

【0008】

一方、細胞の外部からの測定が行なえるに過ぎない上記技術に比べ、パッチクランプ技術は、測定に細胞内部を含めることができるという長所を有している。

【0009】

個々のピペットを使用して慣用的に行なわれているパッチクランプ技術では、これは、顕微鏡により観察しながら、マイクロマニピュレータを用いて、壊れ易いガラスピペットを基板に付着する単一細胞まで移動させ、膜がピペットの口に入念に吸引されるようにすることにより達成される。従って、ガラス表面と膜表

面との直接接触が生じる。これにより、膜パッチがシールされかつ周囲の流体から電氣的に絶縁される。この絶縁は、ギガシールとも呼ばれている。この「細胞附着状態 (cell-attached configuration)」からいわゆる「全細胞状態 (whole cell configuration)」への移行は、シールされた膜を更に吸引することにより達成される。これは、ピペットの下膜セクションに孔を穿けることにより行なわれる。これにより、ピペットの口を介して、細胞内部への流体的および電氣的にシールされたアクセスが行なえる。かくして、残余の細胞膜は、その全体に電氣的にアクセスできる (いわゆる「全細胞パッチ」)。しかしながら、この慣用技術の使用は、高レベルの経験および非常に敏感な接触を必要とする。複数の細胞は連続的に処理できるに過ぎない。従ってこの方法は、例えば、薬品スクリーニング、物質スクリーニング等の分野におけるような大規模な研究には不適である。

【0010】

(発明の開示)

従って本発明の目的は、上記欠点を解決できるように、冒頭で述べた形式の方法および装置を改良することにある。より詳しくは、本発明は、特に、細胞レベルでの薬理的活性成分の作用の実験的および用途指定スクリーニングの分野で望まれているように、複数の細胞に関してできる限り首尾一貫した測定ができるようにしたものである。

【0011】

本発明によれば、上記目的は、冒頭に述べた形式の方法において、圧力差を増大させることにより膜の下面を破裂させ、および／またはポア形成物質の添加によりまたは電流パルスにより、膜を、微孔性かつ電氣的に低抵抗なものとするか破裂させることにより達成される。

【0012】

冒頭に述べた形式の装置では、本発明の上記目的は、少なくとも1つの第2電極を、第1電極からチャンネルの方向に間隔を隔てて配置することにより達成される。

【0013】

かくして、本発明の目的は完全に達成される。

【0014】

慣用のパッチクランプ技術と比較して、本発明は、壊れ易いガラスピペットのやっかいな取扱いを省略できる。なぜならば、慣用のガラスピペットの機能は基板のチャンネルに負圧を付与して、細胞付着状態を確立することにより達成されるからである。かくして、細胞壁と細胞が吸引される表面との間にはメガシールが確立され、本発明によれば、負圧の増大により膜の下面が破裂され、かくしてチャンネルを介して、膜により包囲された細胞内部の全体に亘る測定を行なうことができる。これに加えて、または別の構成として、ポア形成物質を添加することにより、膜を微孔性かつ電氣的に低抵抗なものとすることができる。例えば、ナスタチンまたはアンホテリシンB等のポア形成物質の添加により、膜にポアが形成され、細胞内部への低抵抗アクセスが可能になるが、このアクセスによって大きい分子が拡散されることはない。かくして、この目的のために膜の下面を破壊する必要なくして、生じる膜電流を測定できる。別の形態として、短時間の電気パルスを加えることにより、この領域の膜を透過性にするか、破裂させることができる。

【0015】

本発明の特別な長所は、測定電極が膜から間隔を隔てて配置されるため、細胞の膜が電極上に直接横たわることがないだけでなく、細胞内媒体を介して測定が行なえることである。

【0016】

ドイツ国特許DE 197 12 309 A1による既知の配列は、細胞の直ぐ近傍で膜電流により引き起こされる細胞外測定すなわち電位の変化の測定のみが可能であるのに対し、本発明は、細胞内測定および細胞外測定の両方を行なうことができる。すなわち、膜を横切って得られる電圧を測定しかつチェックすることができる。この目的は、膜内に電流注入することにより優先的に達成される。

【0017】

従って、本発明は、薬品スクリーニング、物質スクリーニング、クローン（遺伝的に変更された生物；GMO）の識別、および多数の細胞について同時にまた

は直接連続的に、生物学的細胞の細胞質が電氣的に測定される物質最適化等の分野の大規模な研究に特に適している。従って本発明は、第1に、完全自動化モードでの慣用のパッチクランプ技術と同じ長所を有する技術を用いるオプションを提供する。従って、自動化された態様でかつ高処理能力で、多くのこのような細胞を並行的に研究できる。

【0018】

本発明の好ましい実施形態では、膜を破裂させる圧力差は、パルス態様で増大される。

【0019】

この構成は、細胞付着状態から全細胞状態への制御された移行を可能にする。

【0020】

原則として、複数のチャンネルを共通基板に設けることができ、かつ負圧の補助により、チャンネルの口で基板の表面に細胞を吸引することができる。

【0021】

しかしながら、本発明の好ましい実施形態によれば、細胞はマイクロキュベットの底部上に位置決めされる。

【0022】

この構成は、研究すべき細胞を含んだ液体媒体が、ピペット等により、各チャンネルの上方に制御された態様で導入されるという長所を有する。共通マウント内に配置された多数のマイクロキュベットは、マイクロキュベットおよび少なくとも1つの測定電極と関連する各チャンネルを介して同時に測定できる。

【0023】

好ましい一方法は、電気信号の測定値として、細胞内部を通る電流 (I_{st}) および/または電極での電位の測定を行なう。

【0024】

本発明による方法の好ましい実施形態では、細胞は、膜の下面からチャンネルの方向に間隔を隔てている電極を介して電氣的にスキヤニングされる。この目的のため、電流が、細胞内に注入される。

【0025】

この構成は、細胞の内部のみへの直接的な電氣的アクセスが確立されるという長所を有している。細胞の外膜がマイクロキューベットの底部上にぴったりと当接しかつ負圧により底部の所定位置に固定されるため、細胞内部と細胞外媒体との間に、慣用のパッチクランプ技術から知られているギガシール（すなわち極めて高い漏洩抵抗）が自動的に形成される。電極をギガシールから間隔を隔てて配置することにより、細胞自体は電氣的絶縁材料と接触するに過ぎず、従って、ギガシールの維持が確保される。

【0026】

本発明による方法の他の好ましい実施形態は、多数のチャンネルを有し、全てのチャンネルにおいて圧力パルスまたは電流パルスが同時に発生される。しかしながら、別の構成として、圧力パルスまたは電流パルスは、任意に選択したシーケンスで、または厳格な連続の手順で、ここに選択したチャンネルに連続的に加えることができる。

【0027】

これらの構成は、多数の細胞について殆ど全ての実験を自動化された態様で行なうことができ、従って、単位時間内に非常に多くの測定が行なえるという長所を有している。

【0028】

本発明による好ましい実施形態では、物質の添加により、細胞内液体媒体の組成が変えられる。或いは、膜が開かれた後または微孔が形成された後に、細胞内液体媒体が置換される。この目的のため、チャンネルを2つ以上の連結チャンネルに連結でき、これらの連結チャンネルのうち1つの連結チャンネルには、細胞質（細胞内流体）の組成と同様な組成を有する電解液または有効成分が添加された特殊流体が充填される。

【0029】

これにより、細胞内媒体の特定の制御された変更が可能であると同時に、実行可能な測定の可能性スペクトルをかなり拡大できる。

【0030】

本発明による装置では、少なくとも1つの第2電極が、第1電極からチャンネル

ルの方向に間隔を隔てて配置されている。

【0031】

好ましい実施形態では、細胞付着状態を得ること、および圧力差のパルス型増大により膜の下面を破裂させることを目的として、圧力差を制御する手段が設けられている。

【0032】

かくして、第1に、信頼性のある制御された態様でメガシールを確立でき、第2に、短時間の圧力パルスにより膜の下面が破裂されかつチャンネル壁に当接する間にメガシールを維持することができる。この制御システムは、静的負圧（オフセット圧力）を連続的に維持し、従って全付着状態（whole-attached configuration）でもメガシールを維持できるように設計するのが好ましい。

【0033】

本発明の他の実施形態によれば、電極は、第1電極から遠い方のチャンネルの側に配置されている。

【0034】

この構成では、電極は、チャンネルの遠い方の端部を環状に包囲している。

【0035】

これらの構成は、電極が、チャンネルが貫通する層の下面上に形成することにより、簡単な態様で微小構造内に一体化できるという長所を有している。

【0036】

しかしながら、本発明の更に別の実施形態では、電極は、該電極から遠い方のチャンネルの端部から間隔を隔てて配置されている。

【0037】

これにより、後述するように、電極をチャンネルに対して移動できるように配置でき、このため、同じ電極を使用して複数の細胞の測定を連続的に行なえるという長所が得られる。

【0038】

本発明の他の特徴によれば、チャンネルは、電極から遠い方の端部が、弁を介して複数の連結チャンネルに連結され、該連結チャンネルを介して流体の供給お

よび排出が行なわれる。

【0039】

この構成は、適当に制御される連結チャンネル内の圧力状態により、ひとたび全細胞状態が確立されると（すなわち、ひとたび膜が破裂されると）、細胞内部が細胞内流体に接触するようになるという長所が得られる。

【0040】

本発明の他の実施形態では、底部に開口が設けられたマイクロキュベットが、基板の上に配置されている。

【0041】

これにより、大規模スクリーニングに特に適した態様で単一または複数のチャンネルが設けられている基板の上方に流体を貯蔵できる。このような構成では、マイクロキュベットを適当なファンネル状に設計することにより、細胞は、基板表面のチャンネル口の直ぐ近傍に案内される。しかしながら、別の構成として、マイクロキュベットの底部の開口の直径を明らかに大きなものとして、付与される負圧によって細胞がチャンネルの口まで案内されるように構成できる。これにより、本発明による構造の製造を容易にできる。

【0042】

また、多数のチャンネルは共通基板に配置するのが好ましい。

【0043】

これにより、簡単な製造と相俟ってコンパクトな設計を達成できる。

【0044】

また、この点で、多数のマイクロキュベットをプレートに配置するのが好ましい。

【0045】

これにより、多くの細胞に関する並行測定または連続的測定を行なうための準備を簡単な態様で行なうことができるという長所が得られる。なぜならば、全てのマイクロキュベットが共通プレートに配置されているからである。

【0046】

マイクロキュベットに共通プレートを使用する本発明の実施形態の場合には、

プレートが多層構造にすることが一層好ましい。

【0047】

この構造は、材料を適当に選択することにより、プレートの種々の要素に関する種々の条件を考慮に入れることができるという長所を有している。

【0048】

このことは、この実施形態の変更形態として、プレートが頂層と、中間層と、底層とからなり、マイクロキューベットが頂層に配置されており、中間層がチャンネルを備えた基板を形成しており、前記チャンネルに通じる連結チャンネルが底層に配置されており、好ましい実施形態では、チャンネルおよび微小電極に導かれている電気リード線を有する構成の場合に特にいえることである。

【0049】

プレートのこのような3分割構造は、3つの重要な機能の各々が、異なる厚さおよび異なる材料からなる個々の層により受け持たれるという長所を有している。

【0050】

本発明の他の実施形態によれば、基板は、チャンネルに通じる連結チャンネルの空間ルーチングを可能にする光学的パターン形成可能材料からなる1つ以上の層を有する底層に接合される。

【0051】

このような構成では、底層はガラスマウントに取り付けることができる。

【0052】

これらの構造は、特にコンパクトな設計および簡単な製造を可能にする。既知の光学的パターン形成可能材料として、或るポリマーがあるが、或るガラスを使用することもできる。

【0053】

連結チャンネルは、 $10 \sim 40 \mu\text{m}$ 、好ましくは約 $20 \mu\text{m}$ の幅を有することが好ましい。

【0054】

チャンネル自体は、 $10 \mu\text{m}$ 以下、好ましくは $5 \mu\text{m}$ 以下の幅を有することが

好ましい。

【0055】

この実施形態では、これらの寸法が最適であることが証明されている。より詳しくは、細胞の直径より小さいチャンネルの内側幅は、チャンネル上に一度に1つの細胞を位置決めすることを促進する。

【0056】

前述のように、本発明のこれらの実施形態で特に好ましいことは、電極を、中間層の下面上または底層の頂面上に配置することである。

【0057】

この構造は、既知の方法（写真製版、エッチング、リフト・オフ等）による簡単な印刷、めっき、蒸着およびその後のマイクロパターニング電極をこれらのリード線と一緒に形成できるという長所を有している。

【0058】

この場合、電極は、上から見た平面図として、一辺の長さが20～60 μm 、好ましくは約40 μm である正方形に形成するのが一層好ましい。

【0059】

この場合には、前述のように、電極に通じる導体トラックを、中間層と底層との間に配置することができる。これは、導体トラックを中間層の底部または底層の頂部に取り付けることにより行なうことができる。中間層の下面に取り付けると、同じ材料、特に貴金属（好ましくは金）を使用して、導体トラックを電極と一緒に形成できるという長所を有している。

【0060】

この実施形態では、導体トラックは、5～30 μm 、より詳しくは約10 μm の幅を有することが好ましい。

【0061】

前述のように、多層構造のプレートの場合には、個々の層に異なる材料を使用できる。

【0062】

種々の層は、例えばプラスチック、ポリメチルメタクリレート（PMMA）、

シリコン、PTFE、ポリイミド、または無機材料特にガラス、セラミック材料またはシリコンから互いに独立して作ることができる。

【0063】

基板として使用するのに好ましい材料はポリイミドであり、ポリイミドは、この目的として、ドリル孔としてチャンネルが形成されているシートとして用いられる。この場合、基板（シート）は、2～40 μm の間、好ましくは約5 μm の厚さを有することが好ましい。

【0064】

底層に使用される好ましい材料はガラスである。機械的安定性を確保できる事実上任意の厚さのガラスで、必要な連結チャンネル等を慣用的な態様で作ることができる。

【0065】

本発明の他の実施形態では、基板を、多数のドリル孔がマイクロキューベットとして形成されているプレートの下面に配置するのが好ましい。マイクロキューベットの底の孔は、基板のチャンネルを整合させることにより形成される。

【0066】

かくして、個々のチャンネルおよび電極が割り当てられる複数のマイクロキューベットを備えた結合型本体を比較的簡単に作ることができる。

【0067】

本発明の他の実施形態によれば、基板の下面に向って開口しているチャンバを備えた流体／測定ユニットが設けられている。流体／測定ユニットは、チャンバが、選択されたチャンバに連通しかつ外面に対してシールされるようにして、基板の下面に配置できる。チャンバは、少なくとも1つの電極を有しかつ負圧源に連結された少なくとも1つのターミナルチャンネルに連結可能である。

【0068】

また、プレートと、負圧／測定ユニットとを互いに横行させかつ位置決めする横行ユニットを設けることができる。

【0069】

かくして、単一測定ユニットを使用して、多数の細胞を連続的に測定すること

ができ、これによりコストをかなり節約できる。

【0070】

この目的のため、商業的に入手できる慣用の標準格子プレート（いわゆる、「96ウェルプレート」、「384ウェルプレート」等）を優先的に使用できる。これらは、チャンネル（孔）が設けられたシートを付与して底をシールすればよい。

【0071】

次に、負圧／測定ユニットを横行させるか、逆に、静止する負圧／測定ユニットに対して標準格子プレートを横行させることにより、ウェルプレートのドリル孔内の多くの個々の細胞の測定が連続的に行なわれる。負圧／測定ユニットは、負圧パルスが発生して細胞を開き、かつ細胞内部を通る連続測定を行なうための電極を有している。

【0072】

この場合にも、前述のように、チャンバを弁を介して多数のターミナルチャンネルに連結して、全細胞状態が確立された後に細胞内部を細胞内流体に接触させることができ、または細胞内流体の組成を変えることができる。

【0073】

（発明を実施するための最良の形態）

本発明の他の長所は、以下の説明および添付図面から理解されよう。

【0074】

上記特徴および以下に説明する他の特徴は、各場合に特定される組合せに使用できるだけでなく、本発明の範囲を逸脱しない他の組合せにも使用できることはもちろんである。

【0075】

以下、添付図面に示す本発明の例示実施形態をより詳細に説明する。

例1

図1～図4において、参照番号10はプレートを示す。プレート10の表面11には、成形により、マイクロキュベット12の格子が形成されている。マイクロキュベット12は3次元形状をなし、かつ細胞を培養するのに適した寸法を有

している。プレート10には、例えば $8 \times 12 = 96$ 個のマイクロキュベット12が配置されている。

【0076】

矢印14は、マイクロキュベット12が、研究すべき細胞を含有する流体で特に上方から充填できることを示している。これにより、各マイクロキュベット12に、異なる流体および細胞を個々に充填することが可能になる。

【0077】

測定を行なう目的で電気ターミナルモジュール16が設けられており、該電気ターミナルモジュール16は横方向からプレート10にドッキングできる。この目的のため、非常に多くのプラグ18が設けられている。プラグ18は導体トラックのネットワークに接続され、これらの導体トラックは、後述のようにマイクロキュベット12の近傍に配置されている電極に接続される。電気ターミナルモジュール16からは、データライン20がコントローラ22まで延びている。

【0078】

流体ターミナルモジュール24も設けられており、該流体ターミナルモジュール24は、対応する多数の流体プラグ26を介して、横方向からプレート10にドッキングされる。流体ターミナルモジュール24を使用することにより、詳細に後述するように、マイクロキュベット12の下に、所定の態様で、より詳しくは個々に、特にパルス型時間関数 (pulse-shaped function of time) として、負圧を発生させることができる。

【0079】

この目的のため、流体プラグ26は、マイクロキュベット12の底部でのチャンネルと開口49とを連結するネットワークを介してマイクロキュベット12に連結されている。全てのマイクロキュベット12に同じ負圧が加えられる場合には、全ての連結チャンネルは並列に連結され、かつ流体ターミナルモジュール24内で、中央の制御された負圧源に直接リンクされる。しかしながら、個々のマイクロキュベット12が個々の負圧により駆動される場合には、連結チャンネルのネットワークに連結された中央負圧源を同様に使用でき、この場合には、連結チャンネルは、個別的に制御できる弁を有している。しかしながら、別の構成と

して、連結チャンネルに、ミニチュアポンプ、より詳しくは個々に駆動システムされるミニチュア膜ポンプを設けることができる。弁および／またはミニチュアポンプの電氣的作動は、電気ターミナルモジュール 1 6 または流体ターミナルモジュール 2 4 を介して行なうことができる。各場合において、上記要素を駆動するライン 2 8 が、流体ターミナルモジュール 2 4 からコントローラ 2 2 まで延びている。

【0080】

コントローラ 2 2 はマルチプレクサ 3 0 に接続されていて、複数の測定を所定の態様で、すなわち同時にまたは任意であるが連続的に行なうことができる。

【0081】

図 2 から理解されようが、プレート 1 0 は、本質的に 3 つの層からなる。底層 3 2 の上には、シートの形態をなす中間層すなわち基板 3 4 が配置されている。頂層 3 6 が、微小パターンをもつ層として形成されている。この構成の底層 3 2 は、ガラスで作るのが好ましい。基板 3 4 は、ポリイミドシートが好ましい。これに対し、微小パターン層 3 6 は、ポリメチルメタクリレート（PMMA）で作るのが好ましい。

【0082】

底層 3 2 の頂面には連結チャンネル 3 8 が形成されている。連結チャンネル 3 8 は、図 2 示すようにマイクロキューベット 1 2 を個々に駆動する。連結チャンネル 3 8 は、基板 3 4 の垂直チャンネル 4 0 を介して、マイクロキューベット 1 2 の底部 4 8 の開口 4 9 に連通している。マイクロキューベット 1 2 の頂部には円筒状セクション 4 2 が設けられており、該円筒状セクション 4 2 は基準電極 4 4 でライニングされている。基準電極 4 4 は、第 1 電気ターミナル 4 6 に接続されており、該ターミナル 4 6 は接地するのが好ましい。

【0083】

円筒状セクション 4 2 の下端部には底部 4 8 を形成するファンネル型セクションが形成されており、該ファンネル型セクションには開口 4 9 が設けられている。

【0084】

垂直チャンネル40の下端部の回りには、電極50がほぼ環状に配置される。この目的のため、電極50は、基板34の下面に取り付けられる。電極50は、底層32と基板34との間に通されたリード線52に接続されている。リード線52は、例えば電極50と一緒に、印刷、蒸着またはめっき等により基板34の下面に形成することができる。リード線52は、第2電気ターミナル54に接続されている。

【0085】

電極46、50は、銀／塩化銀（Ag／AgCl）からなる。この形式の電極は、当業界で、「可逆性」または「無極性」電極と呼ばれている。これらの電極は、細胞のAC電圧測定すなわち電位スパイクの測定だけでなく、DC電圧測定も可能であるという長所を有している。また、これらの電極は電流注入にも使用できる。

【0086】

両電極46、50間で、電圧 U_{amp} が測定される。また、電圧測定と並行して、刺激電流 I_{st} が第2ターミナル54を介して供給される。これは、図4を参照してより詳細に後述する。

【0087】

図3の平面図から理解されようが、プレート10には、格子の形態をなす複数の電極12が配置されており、格子間隔 d は0.1～1.0mmの間、好ましくは約9mmである。

【0088】

円筒状セクション42の領域内のマイクロキュベット12は、充填が容易に行なえるように、約1～9mm、好ましくは約7mmの内側半径 r を有する。垂直チャンネル40の内側幅 x は10 μ m以下、好ましくは5 μ m以下である。

【0089】

コネクタトラック52は、5～30 μ m、好ましくは約10 μ mの幅 b_1 を有する。電極50は、上方から見た平面図で、一边が20～60 μ m、好ましくは約40 μ mの長さを有する正方形に設計するのが好ましい。連結チャンネル38は、10～40 μ m、好ましくは約20 μ mの幅 b_2 を有する。

【0090】

基板34すなわちフィルムは、2～40 μm 、好ましくは約5 μm の厚さを有している。

【0091】

プレート10の縁部からのマイクロキュベット12の距離1（エル）は少なくとも2 cmあり、従って、高い分路抵抗すなわち個々の電極の電氣的減結合を達成することが好ましい。

【0092】

電極50およびコネクタトラック52は、金で作るのが好ましい。

【0093】

図2はまた、連結チャンネル38内にマイクロポンプ56を一体化できかつ該マイクロポンプが第3ターミナル58により駆動されることを示している。マイクロポンプ56の使用または中央負圧源の使用（連結チャンネル38内に弁を組み込むことは任意である）により、経時的変動を制御できる負圧を連結チャンネル38内に確立できる。

【0094】

図4は、細胞60がマイクロキュベット12の底部48に沈降している状況をかなり拡大して示すものである。これは、重力により達成するか、好ましくはチャンネル40内に一定の負圧を加えることにより制御された態様で細胞60を吸引することにより達成される。マイクロキュベット12の底部48の断面形状がファンネル状であることにより、単一の細胞60のみをチャンネル40上のマイクロキュベット12の底部48で開口49上に位置決めできる効果を一層高めることができる。

【0095】

図4において、細胞60の外側スキンすなわち外膜が参照番号62で示され、細胞内部が参照番号64で示されている。細胞60は周囲流体66中に位置している。周囲流体66は、図示の特定例では、連結チャンネル38およびチャンネル40を充填できかつこれらと置換できる。細胞60の下面68は、底部49上に位置している。

【0096】

この位置に到達するや否や、図4に矢印70で示すように、連結チャンネル38内に負圧パルスが発生される。この負圧パルス70は、細胞の下面68が破裂して、カラー72の態様でチャンネル40内に吸引される程の大きさである。次に、細胞内部64が、チャンネル40および該チャンネル内の液体に直接連通する。別の構成として、低圧パルスを使用しないで、例えばナスタチン (nyastatin) またはアンホテリシンB等のポア形成物質を添加することにより膜を透過可能なものとし、これにより、大きな分子を細胞を通して拡散させることなく細胞内部への低抵抗アクセスを行なうことができる。

【0097】

また図4には、細胞60の電気等価回路が示されている。

【0098】

符号 R_M および C_M は、それぞれ、膜62の抵抗およびキャパシタンスを示す。符号 R_S は、シール抵抗、すなわち細胞内部64と細胞外部の媒体66との間の絶縁抵抗である。また、 R_P は細胞内部64と電極50との間の抵抗、および R_K は電極50と基準電極44との間の抵抗である。

【0099】

比較的遠隔の電極50に到達してはいないがチャンネル40内に吸引されておりかつ壁48に当接しているカラー72の結果として、抵抗 R_S の値は非常に大きい（「ギガシール」）。

【0100】

ゼロ電流状態、すなわちターミナル54を介しておよび連結チャンネル38を介して電流が全く流れていない状態では、電圧 U_{amp} は、細胞膜で得られる膜電圧 U_M に等しい。一方、連結チャンネル38を通して限定電流が流れることができ、次の関係が適用される。

【0101】

【数1】

$$U_{amp} = \frac{R_K}{R_K + R_P} U_M$$

すなわち、膜電圧 U_M は、電圧 U_{amp} に比例する。

【0102】

第2ターミナル54に刺激電流 I_{ST} が供給されると、定常状態における膜電圧 U について次の関係が維持される。

【0103】

【数2】

$$U_M = \frac{R_S \cdot R_M}{R_M + R_S} I_{ST}$$

$R_K \gg R_P + R_S R_m / (R_S + R_m)$ の場合には、この条件は、本発明により、小さいチャンネル断面をもつ十分に長い連結チャンネルにより満たされる。

【0104】

従って、電解液を介して所要負圧を発生させることにより、および細胞60を開く作用を引き起こす低圧パルス70を付加的に発生させることにより、マイクロキューベット12の底部48において、細胞60との流体的および電氣的接触が上記態様で行なわれる。

比較例

本発明による方法と、ドイツ国特許DE197 12 309 A1による従来技術による方法との差を示すため、図5には、図4と同様な図面であるが、従来技術による既知の構造が示されている。ここで、図4の構成要素と同じ構成要素は、同一数字に符号「a」を付加した参照番号で示されている。

【0105】

図5から明瞭に理解されようが、この従来技術では、細胞60aが電極50a上に直接載っている。従って、細胞60aへの電気入力は、外側から、すなわち膜62aの外部から行なわれる。この従来技術のチャンネル40aは、特定の微小負圧を付与することにより細胞60aを底部48aに誘引して該底部48aに

固定配置することによりのみ使用され、この従来技術の底部 48 a は、本発明とは異なり、電極 50 a により形成されている。

【0106】

この従来技術では、チャンネル 40 a を介して細胞 60 a に負圧が加えられて膜 62 が開かれるようなことがあると（この点については、上記ドイツ国特許では全く言及されていない）、細胞 60 a の下面 68 a のカラー 72 a は、チャンネル 40 a の領域内の電極 50 a を覆う形状になるであろう。従って、細胞 60 a が開かれても、電極 50 が細胞内部 64 a を介して直接測定を行なうことは依然として不可能であり、膜 62 a の外面に当接し続けるだけである。この従来技術の装置では、細胞 60 a の下面 68 a が開いていても、測定は、負圧によって細胞 60 a が開かれない場合について説明した状況と全く異なることがない。

例 2

最後に、図 6 には、本発明による装置の他の特定実施形態が示されている。

【0107】

図 6 において、参照番号 80 は、慣用設計のプレートを示す。この形式のプレート 80 は、「96 ウェルプレート (96-well plate)」と呼ばれている。このプレート 80 は、格子状に配置された 96 個の垂直円筒状のドリル孔 84 を有している。これらのドリル孔は、マイクロキュベットとして使用される。図 6 の右側上部に破線で示すように、プレート 80 は、他の実施形態として多層、より詳しくは二重層設計で形成できる。

【0108】

円筒状ドリル孔すなわちマイクロキュベット 84 の底部 82 は、プレート 80 の下面に接着、溶接または他の何らかの方法で接合されたシートの形態をなす基板 86 により形成されている。ドリル孔の各底部の中央で、基板 86 には孔の形態をなすチャンネル 88 が設けられている。

【0109】

図 2 ～ 図 4 に示した本発明の例示実施形態とは異なり、基板 86 の下には、チャンネルを連結するシステムを備えた支持体は全く存在しない。その代わりに、横行可能な流体／測定ユニット 90 が設けられており、該ユニット 90 は、シー

ト 8 6 の下面まで、下から上へと個々に移動できる。

【0110】

ユニット 9 0 はバレル型チャンバ 9 2 を有し、該チャンバ 9 2 はの上端面にはリングシール 9 4 が設けられている。かくして、チャンバ 9 2 は、該チャンバ 9 2 の垂直軸線が一度に孔 8 8 の軸線と整合するようにして、下面 9 1 にぴったりドッキングできる。

【0111】

チャンバ 9 2 は、導管 9 6 を介して負圧ユニット（図示せず）に導かれている。かくして、チャンバ 9 2 内部には、矢印 9 8 に示すように、負圧パルスが発生される。

【0112】

チャンバ 9 2 の底部には電極 1 0 0 が配置されており、該電極 1 0 0 は外部ターミナル 1 0 2 に接続されている。

【0113】

参照番号 1 0 4 は多軸横行ユニットを示す。横行ユニット 1 0 4 は、流体／測定ユニット 9 0 を、下面 9 1 に沿って、特に、マイクロキュベット 8 4 からマイクロキュベット 8 4 へと案内し、次に、ユニット 9 0 を、対象とするそれぞれの孔 8 8 の回りで下面 9 1 に対して下方からぴったりと押し付けることができる。負圧パルス 9 8 を導管 9 6 に付与することにより、本発明の第 1 特定実施形態に関して図 4 を参照して前述したのと同じ実験を行なうことができる。

【0114】

図 2 ～図 4 に示した本発明の第 1 例示実施形態は、マイクロキュベット 1 2 を駆動する全ての連結チャンネルを備えたコンパクトプレートを利用でき、これにより、他の駆動装置を全く使用することなく単に弁、接点等を駆動するだけで、多くの測定を連続的にすなわち多重モードで行なうことができるという長所を有している。

【0115】

これに対し、図 6 に示す第 2 例示実施形態は、商業的に入手できるプレートを使用できること、および多数の連結チャンネル、コネクタトラックおよび個々の

電極を備えた底層の費用を節約できる。

例 3

図 7 a) ~ 図 7 c) は、以下により詳細に説明する本発明の更に別の実施形態の概略説明図である。

【0116】

この実施形態でも、基板 110 は、例えばポリイミドシートで形成できる。基板 110 には複数のチャンネルが形成されており、参照番号 122 で示す 1 つのチャンネルが示されている。基板 110 の上には流体が存在し、該流体は細胞 112 を含有している。チャンネル 122 の下には、該チャンネル 122 に連通しているチャンバ 124 が形成されており、該チャンバ 124 の底部には、図 6 の実施形態と同様な構成の電極 126 が設けられている。

【0117】

しかしながら、このチャンバ 124 は、上記実施形態とは異なり、単一の連結チャンネルに連通しているのではなく、2 つの連結チャンネル 130、132 に連通している。これらの連結チャンネル 130、132 は、弁 118、120 を介して、流体リザーバ F_1 、 F_2 に連結される。

【0118】

図面は全く概略的なものであること、連結チャンネル 130、132 は例えば光重合可能な層内に形成できること、および弁はチャンネルの外端部に形成するのが好ましいことはもちろんである。

【0119】

図 7 a) に示すように、弁 120 が閉位置にありかつ弁 118 が開位置にある場合に、流体 114 の圧力 P_0 より低い圧力 P_1 をチャンネル 130 に付与すると、チャンネル 122 およびフィーダチャンネル 130 を通る矢印 133 方向の流れが確立される。これにより、細胞 112 は、チャンネル 122 のオリフィスの上方で基板 110 の表面 128 上に吸引されかつ沈降され、負圧が維持される限りメガシールが形成されるため、細胞付着状態が確立される。

【0120】

次に、図 7 b) に示すように、 $P_1 < P_2 < P_0$ の関係を維持したまま弁 120

を開くと、チャンバ124には流体リザーバ F_2 からの細胞内媒体が充填され、同時に、連結チャンネル132からチャンバ124を通してフィードチャンネル130内に向う矢印134方向の流れが確立される。連結チャンネル132から連結チャンネル130に向う、矢印134で示す流れが生じるこの状況では、圧力 P_2 は圧力 P_1 より高くなくてはならず、また、両圧力 P_1 、 P_2 は、細胞を包囲する細胞外媒体114の圧力より低くなくてはならない。

【0121】

図7c)に示す次のフェーズでは、弁118が閉じられかつパルス態様の負圧が連結チャンネル132に付与される。このため、圧力 P_2 が圧力 P_0 より非常に低くなる($P_2 \ll P_0$)。これにより、細胞112の膜の下面(膜パッチ)が、負圧サージにより吸引されかつ破裂されて、全細胞パッチクランプ(whole-cell patch clamp)が確立される。このフェーズ中の流れは、チャンネル122および連結チャンネル132を通して流体リザーバ F_2 に向う、矢印135で示す方向である。次に、チャンバ124が細胞内媒体116のみで充填された状態に到達する。次に、測定を行なう上で望まれる場合には、弁118を介して他の何らかの媒体を再び対象とすることができる。

【0122】

この構成およびこの方法の長所は、正確に制御された細胞内媒体(その組成は変えられる)を対象にできること、または異なる細胞内媒体をも使用できることである。

【0123】

弁を介して制御できる2つ以上の連結チャンネルを有するこの実施形態は、原理的に、図1～図4を参照して前述した実施形態および図6の実施形態のいずれと組み合わせることもできる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明による装置の特定実施形態を示す例示概略斜視図である。

【図2】

図1に示した構造のマイクロキューベットの高度に概略化して示す断面図である

。

【図 3】

図 2 に示したマイクロキューベットを上方から見たものを僅かに縮尺して示す平面図である。

【図 4】

本発明による方法を示すため、図 2 の一部をかなり拡大して示す詳細図である。

。

【図 5】

従来技術を示す、図 3 と同様な図面である。

【図 6】

本発明による装置の他の特定実施形態を示す拡大詳細斜視図である。

【図 7 a）】

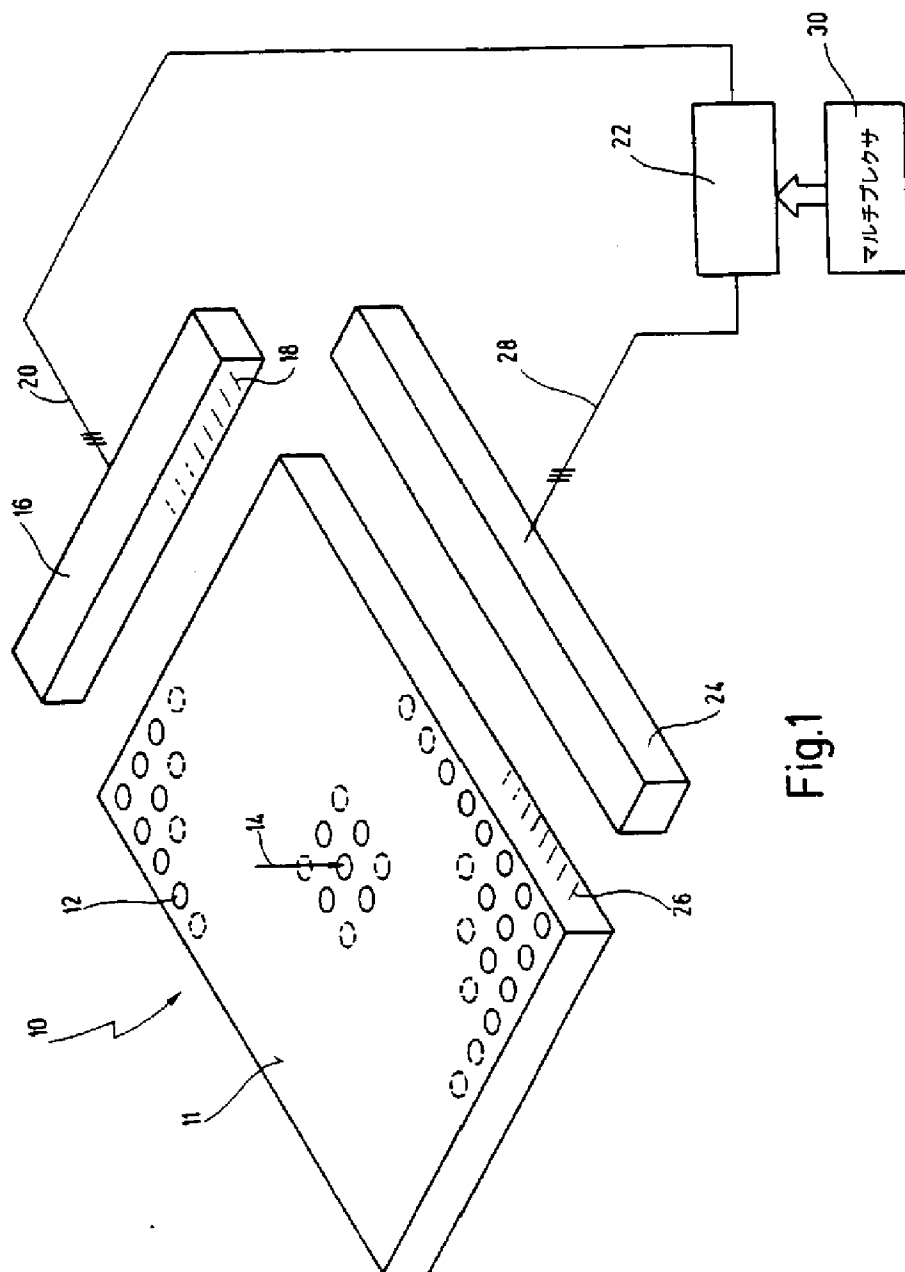
チャンネルへの 2 つの連結チャンネルを使用するときに細胞が吸引されるフェーズを示す簡単化した概略図である。

【図 7 b）】

チャンネルへの 2 つの連結チャンネルを使用するときに細胞付着状態が確立されるフェーズを示す簡単化した概略図である。

【図 7 c）】

チャンネルへの 2 つの連結チャンネルを使用するときに全細胞状態が確立されるフェーズを示す簡単化した概略図である。



【图2】

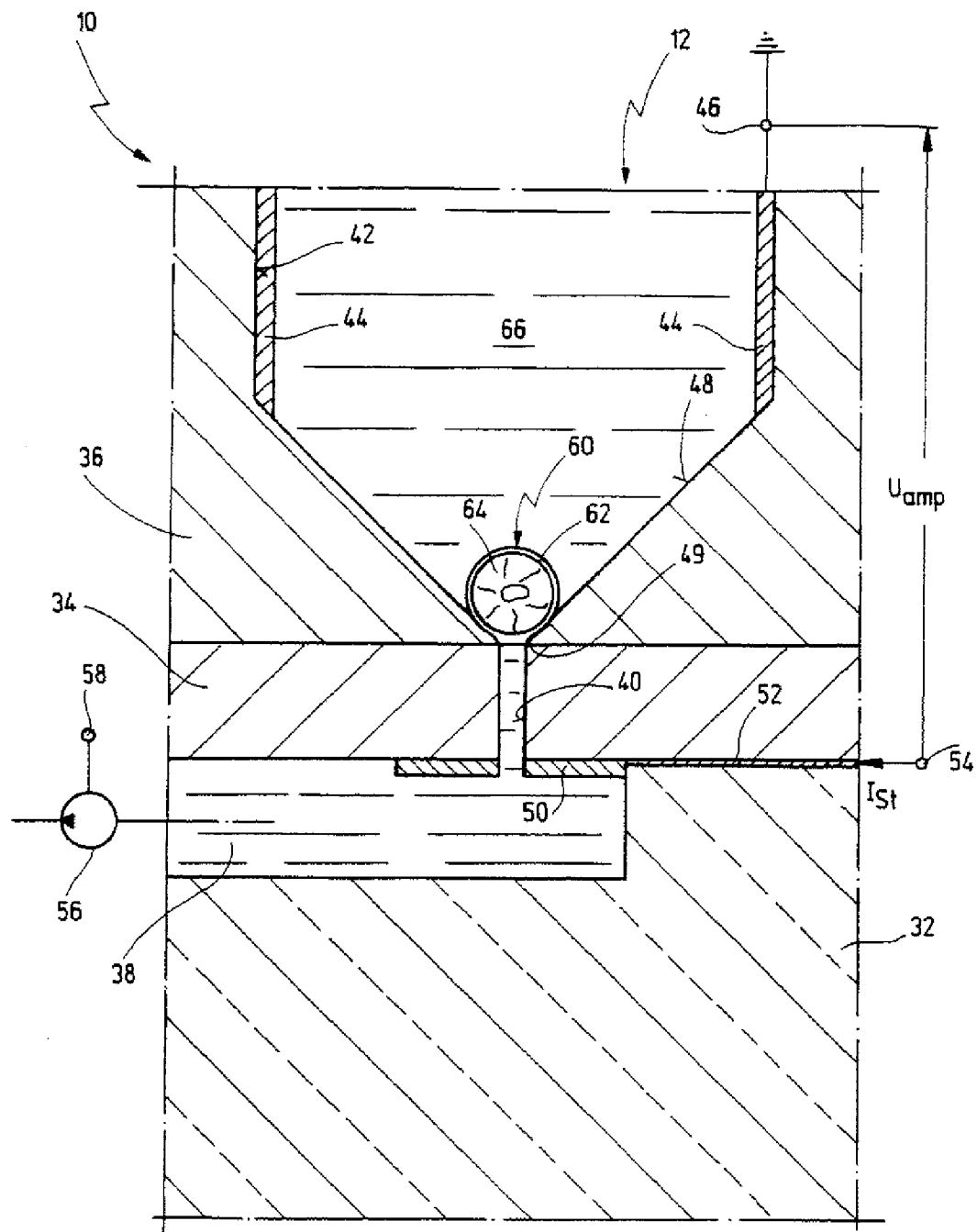
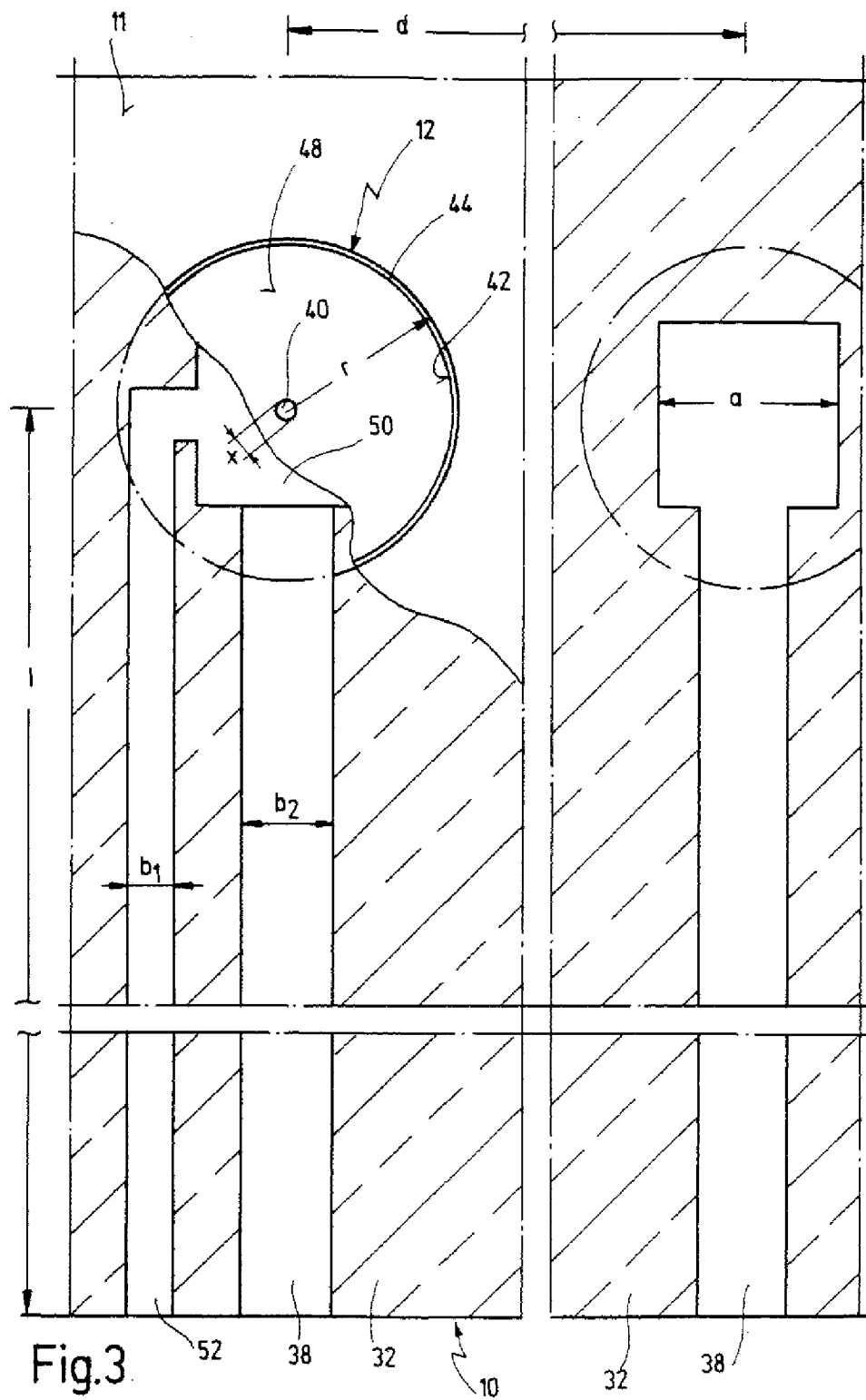


Fig.2

【図3】



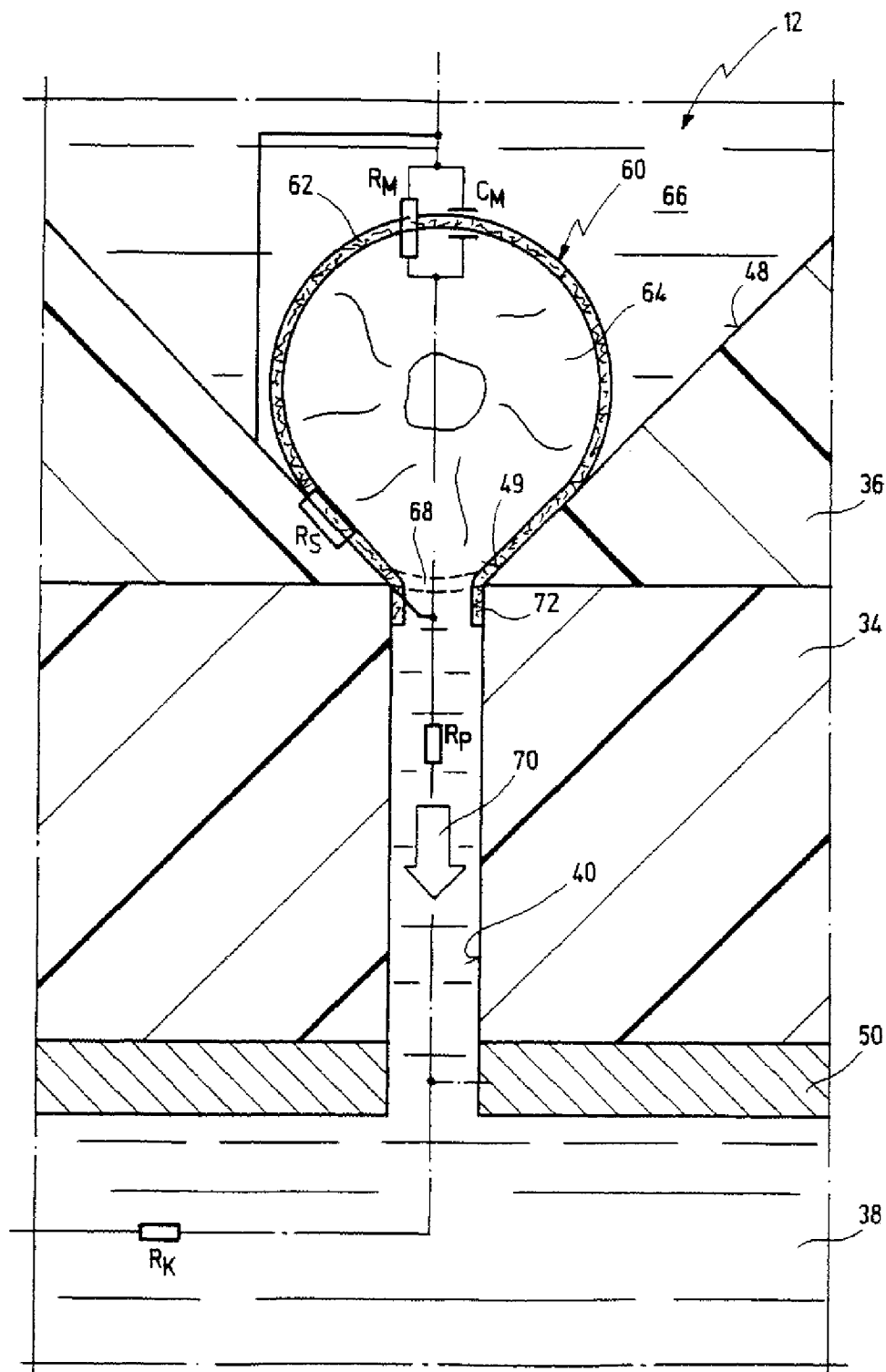


Fig.4

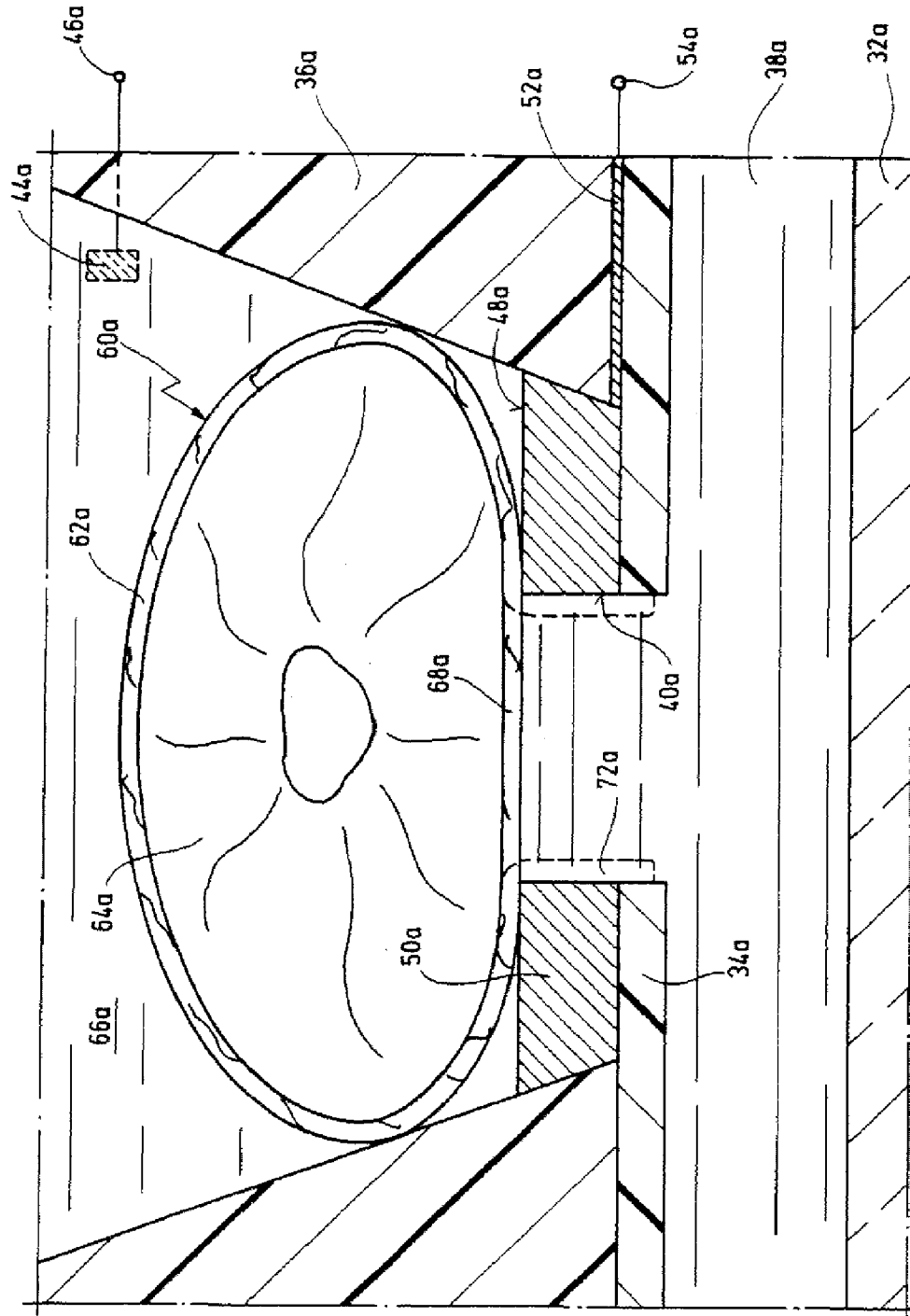


Fig. 5
STAND DER TECHNIK

【図6】

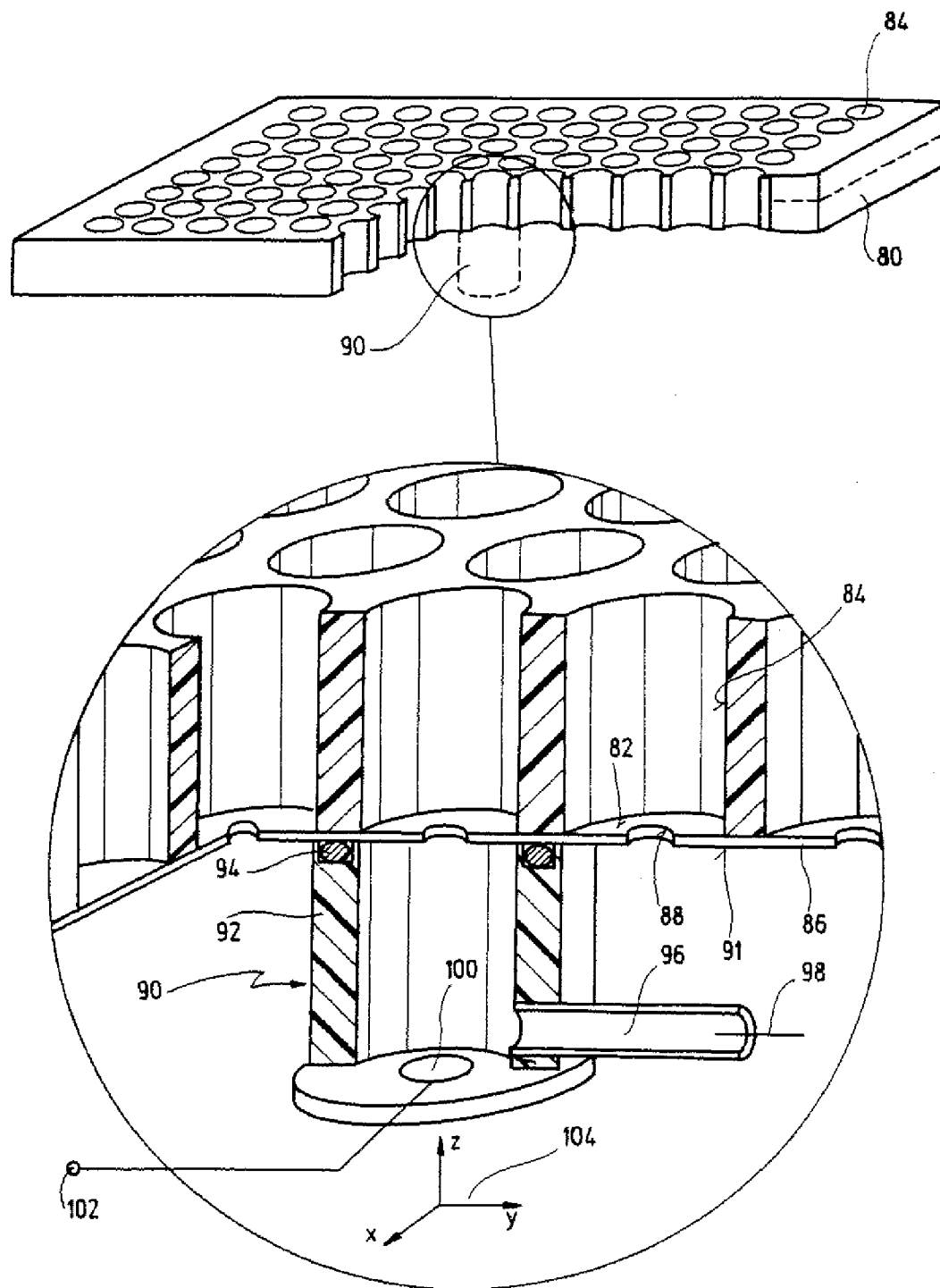


Fig.6

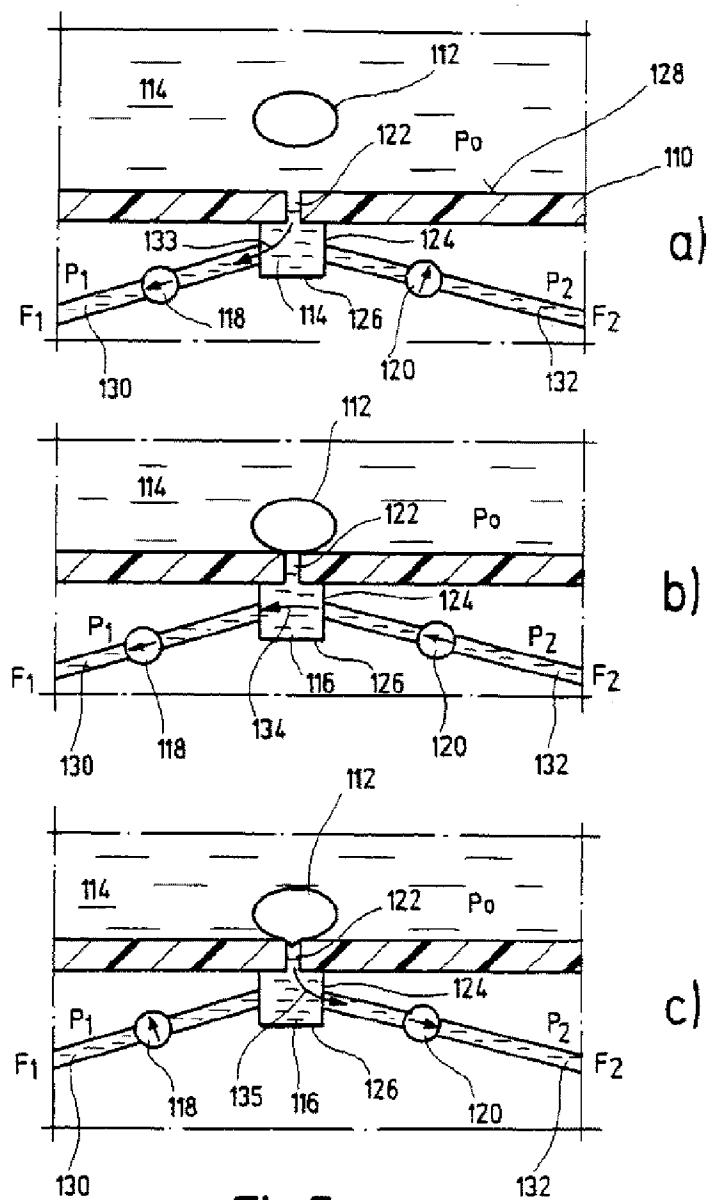


Fig.7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 00/08895

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/487 G01N27/403

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, INSPEC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 198 41 337 C (MICRONAS INTERMETALL GMBH) 23 September 1999 (1999-09-23)	9-12
Y	column 2, line 20 - line 48 column 3, line 8 - line 12 column 3, line 27 - line 44 column 4, line 27 - line 47 column 5, line 35 - line 41 column 6, line 33 - line 41 column 7, line 32 - line 51 column 8, line 36 - line 65 column 11, line 4 - line 23 column 12, line 28 - line 56 -- -/-	1-8, 15, 17, 18, 20, 21, 23, 27

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 November 2000

Date of mailing of the international search report

12/12/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx: 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stussi, E

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

page 1 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 00/08895

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	E. NEHER AND B. SAKMANN: "Single channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibers" NATURE, vol. 260, 1976, pages 799-802, XP000943702 London column 1 -column 2; figure 1	1,2,4-8
X,P	DE 198 27 957 A (MICRONAS INTERMETALL GMBH) 9 December 1999 (1999-12-09) column 1 -column 4 column 6, line 39 - line 50 column 15, line 68 -column 16, line 42; figure 22	1,2,4,5, 8-12
Y	DE 197 12 309 A (NMI NATURWISSENSCHAFTLICHES UN) 20 May 1998 (1998-05-20) cited in the application column 4, line 1 - line 10 column 5, line 48 - line 55 figures 1-3	3,15,17, 18,20, 21,23,27
A	US 5 262 128 A (LEIGHTON STEPHEN B ET AL) 16 November 1993 (1993-11-16) column 2, line 5 - line 41 column 3, line 54 - line 65 column 4, line 25 - line 34 column 4, line 56 -column 5, line 59	13-34
A	WO 97 05922 A (NISCH WILFRIED ;NMI NATURWISSENSCHAFTLICHES UN (DE)) 20 February 1997 (1997-02-20) cited in the application the whole document	1-34
A	EP 0 627 621 A (AVL MEDICAL INSTR AG) 7 December 1994 (1994-12-07) the whole document	1-34
A	EP 0 689 051 A (MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD) 27 December 1995 (1995-12-27) the whole document	1-34
A	DE 196 46 505 A (ITT IND GMBH DEUTSCHE) 14 May 1998 (1998-05-14) the whole document	13-34

3

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

page 2 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/EP 00/08895

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19841337 C	23-09-1999	EP 0962524 A	08-12-1999
		JP 11346764 A	21-12-1999
		DE 19827957 A	09-12-1999
		EP 0960933 A	01-12-1999
		JP 11346794 A	21-12-1999
DE 19827957 A	09-12-1999	DE 19841337 C	23-09-1999
		EP 0962524 A	08-12-1999
		EP 0960933 A	01-12-1999
		JP 11346764 A	21-12-1999
		JP 11346794 A	21-12-1999
DE 19712309 A	20-05-1998	WO 9822819 A	28-05-1998
		EP 0938674 A	01-09-1999
US 5262128 A	16-11-1993	AU 6640190 A	16-05-1991
		EP 0497885 A	12-08-1992
		WO 9105519 A	02-05-1991
WO 9705922 A	20-02-1997	DE 19529371 A	13-02-1997
		EP 0844896 A	03-06-1998
		JP 11511248 T	28-09-1999
		US 6032062 A	29-02-2000
EP 0627621 A	07-12-1994	JP 2641400 B	13-08-1997
		JP 7218510 A	18-08-1995
		US 5489515 A	06-02-1996
		DE 59306529 D	26-06-1997
EP 0689051 A	27-12-1995	CN 1131744 A	25-09-1996
		JP 8062209 A	08-03-1996
		KR 150390 B	01-10-1998
		US 5563067 A	08-10-1996
DE 19646505 A	14-05-1998	DE 59702254 D	28-09-2000
		WO 9820974 A	22-05-1998
		EP 0938383 A	01-09-1999

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 ステルツリー マルティン
ドイツ連邦共和国 72776 ロイトリンゲン
ロスネットシュトラッセ 20/6

(72)発明者 シュテット アルフレッド
ドイツ連邦共和国 72768 ロイトリンゲン
マテウスーヴァグネル シュトラッセ
43/4

(72)発明者 クラン トマス
ドイツ連邦共和国 58135 ハゲン ヴィー
ーネル シュトラッセ 29

(72)発明者 ミューラー トマス
ドイツ連邦共和国 53225 ボンボーイエ
ル リルケシュトラッセ 86

(72)発明者 メチフェスセル クリストフ
ドイツ連邦共和国 42327 ヴッペルタル
キルクホフシュトラッセ 94

Fターム(参考) 2G045 BB20 CB01 FB05
4B029 AA07 BB01 CC01 FA15
4B063 QA20 QQ05 QS39 QX04 QX05